基于重组毕赤酵母的 fusaruside 生物合成

田园，李艳玲

（泰山医学院，生命科学学院，山东 泰安 271016）

摘要:目的：构建产 fusaruside 的毕赤酵母菌株，解决天然小分子免疫抑制剂 fusaruside 的来源问题。**方法：**从禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* PH-1 中扩增获得合成 fusaruside 的相关基因—3 位去饱和酶（Δ3(E)-SD）和 10 位去饱和酶（Δ10(E)-SD）基因；并通过 2A 肽策略构建两种基因的共表达载体，转化到毕赤酵母 GS115 中进行双酶的诱导表达；对诱导后的毕赤酵母菌体进行甲醇和二氯甲烷的处理后,经高效液相色谱质谱联用仪(HPLC-MS)检测其中产物变化。**结果：**3 位去饱和酶和 10 位去饱和酶在毕赤酵母中成功共表达,SDS-PAGE 显示 3 位去饱和酶分子量约为 48 kDa,10 位去饱和酶分子量约为 65 kDa；HPLC-MS 显示重组酵母可以产生 fusaruside。**结论：**与 fusaruside 原产菌株镰刀菌相比，该酵母菌的发酵时间更短，产量更高，为 fusaruside 的进一步开发与应用奠定基础。

关键词: 毕赤酵母，去饱和酶，2A 肽，共表达，fusaruside

免疫抑制剂是治疗移植排斥反应和自身免疫疾病的主要药物。但是，目前临床常用的免疫抑制剂存在多种不良反应，长期服用会导致严重的副作用，这多与免疫抑制药物对靶点的选择性不高有关。因此，寻找新的免疫系统疾病治疗靶点以及开发针对这些靶点的高效、低毒、高选择性的新型小分子免疫抑制剂成为当务之急[1]。最近的研究发现，天然小分子化合物 fusaruside 具有良好的选择性免疫抑制作用，可促进磷酸酶 SHP-2 的磷酸化，磷酸化的 SHP-2 可与胞浆中非磷酸化的 STAT1 选择性结合，从而选择性地阻断了 IFN-γ/STAT1/T-bet 的信号通路，靶向效果较好[2-6]，是极具潜力的临床用免疫抑制分子。

然而，fusaruside 是丝状真菌 *Fusarium* sp.的细胞构成物，在微生物中的含量甚微，200 g 粗提物中仅分得 24 mg fusaruside [7]。另外，这类化合物具有结构复杂、化学合成步骤繁琐等特点，且合成过程中有毒试剂的使用会导致环境污染[8]。这些因素严重制约了其深入的药理和生理活性研究。

阐明天然产物的生物合成途径，并以此为基础，利用合成生物学技术，在工程细胞中重组相关生物合成酶，可实现对天然产物规模化、程序化的制备[9,10]。与化学合成相比，目的代谢产物可以由获得的重组菌株发酵大量生产，因而可以降低生产成本和减少环境污染。近期的研究发现，毕赤酵母 *Pichia pastoris* 中含有与丝状真菌 *Fusarium* sp.类似的代谢途径[11]。与丝状真菌相比，*P. pastoris* 具有生长迅速、遗传操作容易、后期处理简单等多方面的优点。若能将 fusaruside 生物合成的相关基因导入到毕赤酵母中，有望使酵母直接产生这种小分子免疫抑制剂，从而快速获得大量的产物。

本研究利用 2A 肽策略，在毕赤酵母中共表达 fusaruside 相关的合成酶，重建 fusaruside 的生物合成途径，获得了可以生产该化合物的重组酵母菌株，以期解决该化合物的来源问题，为 fusaruside 的进

通讯作者: Yuan Tian. Tel: +86-53-8623-5778; E-mail: tianyuan2005hit@163.com

国家自然科学基金(21602152)，山东省自然科学基金(ZR2016BB01)，山东省农业微生物重点实验室开放课题基金(SDKL2017015)资助。

一步开发与应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

毕赤酵母 GS115 菌株、*E. coli* DH5α菌株以及 pPIC3.5K 质粒均为本实验室保存；禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* PH-1 购买自美国菌种保藏中心；Plasmid Mini Kit I、Gel Extraction Kit 购自美国 OMEGA Bio-Tek 公司；RNA 提取试剂盒购、自生工生物工程（上海）公司；限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Bgl* I、dNTP 购自大连 Takara 公司；葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、琼脂糖购自英国 OXOID 公司；甲醇购自美国 Sigma 公司；其余试剂均为国产分析纯。大肠杆菌培养基 LB、毕赤酵母培养基 YPD、选择培养基 MD、诱导表达培养基 BMGY 和 BMMY 及有关培养配方见 Invitrodgen 公司毕赤酵母操作手册。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获取及改造

提取禾谷镰刀菌 *F. graminearum* PH-1 的总 RNA，经反转录获得 cDNA，利用表 1 中所列的 D3-F/D3-R 这对引物扩增 3 位去饱和酶（Δ3(E)-Sphingolipid Desaturase，Δ3(E)-SD，GenBank 登录号：XM_383758.1）基因，利用 D10-F/D10-R 引物扩增 10 位去饱和酶（Δ10(E)-Sphingolipid Desaturase，Δ10(E)-SD，GenBank 登录号：XP_390021.1）基因。

由于选用的 pPIC3.5K 载体酶切位点数量较少，而目的基因中包含这些酶切位点，需要对目的基因进行改造。利用表 1 中所列引物，通过重叠延伸 PCR（Overlap-PCR，OL-PCR）保证目的氨基酸序列不改变的情况下，对基因中含有的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点进行改造，使基因中不再包含这两种酶的酶切位点。

用于共表达的 2A 肽选用最常用的 F2A 肽，来源于口蹄疫病毒（foot-and-mouth disease virus, FMDV），该基因通过化学合成法获得，长度为 66 bp，其序列见表 1。

表 1 所用引物及 2A 肽基因序列

Table 1 Primers used in this study and gene sequence coding 2A peptide

Primer/Gene name	Primer/Gene sequence (5’–3’)	Purpose
D3-F	ATGGCCGAACACCTCGTCTTC	amplication of *Δ3(E)-sd*
D3-R	CTGCCTCTTAAACTTCTTCT	amplication of *Δ3(E)-sd*
D10-F	ATGGCGCATAGCTCTTTCGTT	amplication of *Δ10(E)-sd*
D10-R	CTAGTGATGAGAGAGATCAC	amplication of *Δ10(E)-sd*
D3-F1	GCCACCATGGCCGAACACCTC	modification of *Δ3(E)-sd*
D3-R1	AGTGAAGGATTCCATGTATCCATGAGAAATTG	modification of *Δ3(E)-sd*
D3-F2	CAATTTCTCATGGATACATGGAATCCTTCACT	modification of *Δ3(E)-sd*
D3-R2	GTGGCTCCGGACCCCTGCCTCTTAAACTTCT	modification of *Δ3(E)-sd*
D10-F1	GAAAACCCCGGTCCTATGGCGCATAGCTCTTT	modification of *Δ10(E)-sd*
D10-R1	GCGATATATCGAAGGAACTCGATCCCATAGGCT	modification of *Δ10(E)-sd*
D10-F2	AGCCTATGGGATCGAGTTCCTTCGATATATCGC	modification of *Δ10(E)-sd*
D10-R2	CTAGTGATGAGAGAGATCACCA	modification of *Δ10(E)-sd*
2a	GGGTCCGGAGCCACGAACTTCTCTCTGTTAAAGC AAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCT	-

1.2.2 共表达载体的构建

利用 OL-PCR 的方法，在两段去饱和酶基因（*Δ3(E)-sd* 和*Δ10(E)-sd*）之间插入 2A 肽基因，构成 *Δ3(E)-sd–2a–Δ10(E)-sd* 的组合基因片段，利用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对组合片段和酵母表达载体 pPIC3.5K 进行双酶切，随后连接并转化到 *E. coli* DH5α。

对长出的大肠杆菌进行菌落 PCR 验证，随后再提取阳性菌中的质粒进行 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切验证。

1.2.3 毕赤酵母重组菌株的构建与筛选

将构建好的共表达载体 pPIC3.5K–*Δ3(E)-sd–2a–Δ10(E)-sd* 用 *Bgl* I 进行线性化，随后用碱性磷酸酶进行去磷酸化以防止其发生自连接。处理好的表达载体通过电转化的方式导入到感受态细胞中，具体操作方法如下：载体与 40 μL 感受态细胞轻轻混匀，样品转移到预冷的 2 mm 电转杯中，冰上放置 1 min 后电击（1.5 kV，25 μF，200 Ω，6 ms）一次。电转结束后立即加入 1 mL、1 mol/L 冰预冷的无菌山梨醇，于超净台内将所有溶液转至灭菌离心管中，30 ℃静置 1~2 h，取 300 μL 涂布于含有 1 M 山梨醇和 0.25 mg/mL 遗传霉素的 YPD 平板上。

培养 3~4 d 后，随机挑取若干单菌落，用 YPD 液体培养基振荡培养 24 h，提取染色体 DNA，以引物 D3-F/D10-R 进行 PCR 鉴定，鉴定成功的菌株进行诱导表达。

1.2.4 毕赤酵母重组菌株的诱导表达

P. pastoris 含有醇氧化酶基因启动子（PAOX1），表达载体所携带的外源基因整合于启动子下游，在甲醇诱导下，PAOX1 可驱动下游的外源基因大量表达。将筛选获得的阳性菌株接种于含有 5 mL YPD 培养基的试管中，30 ℃、200 r/min 下振荡培养 1 d；按 2%体积将种子液接种于含有 50 mL 的 BMGY 培养基的 250 mL 三角瓶中；30 ℃、200 r/min 下振荡培养 1 d，离心收集菌体，然后全部转入含 50 mL BMMY 培养基的 250 mL 三角瓶中，30 ℃、200 r/min 下振荡培养。每隔 12 h 添加甲醇至终浓度为 0.5%，同时，每隔 12 h 取样一次，利用 SDS-PAGE 分析菌体中蛋白的表达情况。

1.3 毕赤酵母重组菌株产物分析

1.3.1 Fusaruside 的检测

对成功诱导的酵母菌进行烘干，用甲醇/二氯甲烷（v/v = 1:1）对干燥的菌体进行浸泡萃取 3 次，获得的浸提液经旋转蒸发仪蒸干。取微量浸膏经 HPLC-MS 检测 fusaruside 产生情况，同时未转化重组载体的毕赤酵母菌作为阴性对照，样品 fusaruside 和其前体物质 cerebroside B 为阳性对照。

所用 HPLC-MS 仪器为安捷伦高分辨四级杆飞行时间串联液质联用仪，HPLC 分离条件为：ZORBAX Eclipse Plus C18 柱，100 mm × 4.6 mm，3.5 μm，流动相：甲醇-水（v/v = 9:1），流速 0.4 μL/min。

1.3.2 Fusaruside 的分离提取

经 HPLC-MS 检测确定重组酵母菌可以产 fusaruside 之后，对重组毕赤酵母进行大量发酵和诱导表达。离心获得酵母菌体，用甲醇/二氯甲烷（v/v = 1:1）对干燥的菌体进行浸泡萃取 3 次，获得的粗浸膏通过反相硅胶层析柱进行粗分，洗脱条件为 50%、60%、70%、80%、90%、100%的甲醇-水。经 HPLC-MS 示踪，对含有 fusaruside 的样品用凝胶柱 LH-20 进一步细分，用二氯甲烷/甲醇（体积比 1:1）进行洗脱。经 HPLC-MS 示踪，将含有 fusaruside 的样品经 HPLC 进一步分离纯化，最后获得的纯的 fusaruside，并通过氢谱确定 fusaruside 的化学结构。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆与重组载体的构建

Fusaruside 的生物合成基因*Δ3(E)-sd* 和*Δ10(E)-sd* 经表 1 中所列引物扩增，回收 PCR 产物，所得片段长度分别为 1 320 bp 和 1 722 bp（见图 1）。

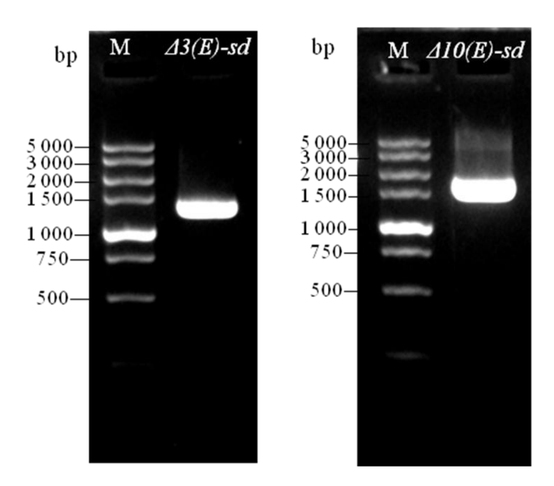


图 1　目的基因 PCR 扩增电泳图

Fig. 1　Agarose gel electrophoresis of PCR amplified target genes. M: DNA marker; *Δ3(E)-sd*: PCR product with *Δ3(E)-sd*; *Δ10(E)-sd*: PCR product with *Δ10(E)-sd*.

利用 OL-PCR 的方法，构建如图 2 所示*Δ3(E)-sd–2a–Δ10(E)-sd* 的组合基因片段，长度约为 3 000bp。

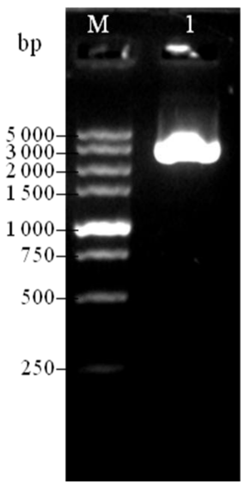


图 2　*Δ3(E)-sd–2a–Δ10(E)-sd* 的组合基因片段 PCR 扩增电泳图

Fig. 2　Agarose gel electrophoresis of PCR amplified *Δ3(E)-sd–2a–Δ10(E)-sd combined gene*. M: DNA marker; 1: PCR product with *Δ3(E)-sd–2a–Δ10(E)-sd*.

利用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对组合片段和酵母表达载体 pPIC3.5K 进行双酶切，随后连接并转化到大肠杆菌中。对长出的大肠杆菌菌落进行 PCR 验证，获得数个阳性菌株。提取阳性克隆中的质粒后进行酶切验证，构建好的共表达载体示意图及酶切验证结果如图 3 所示，表明成功获得双酶共表达载体 pPIC3.5K–*Δ3(E)-sd–2a–Δ10(E)-sd*。

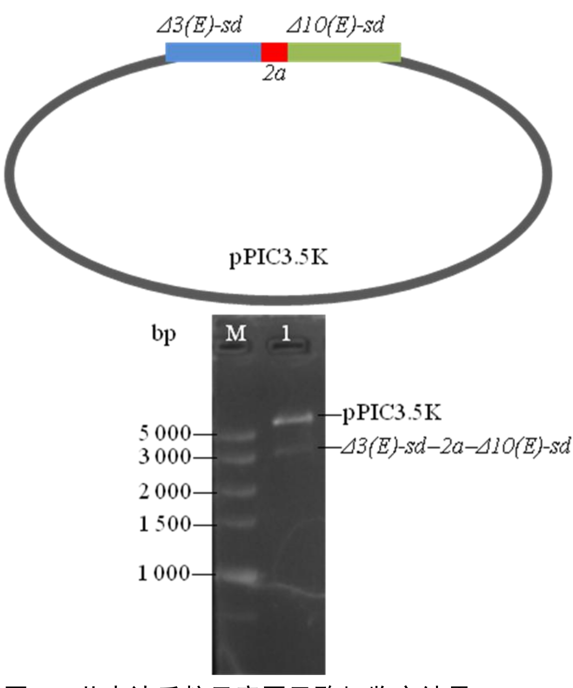


图 3　共表达质粒示意图及酶切鉴定结果

Fig. 3　Schematic of co-expression plasmid and identification by digestion. M: DNA marker; 1: product of double enzyme digestion.

2.2 重组菌株的构建及诱导表达

利用电转化的方式将共表达质粒 pPIC3.5K–*Δ3(E)-sd–2a–Δ10(E)-sd* 转入毕赤酵母 GS115，利用含有遗传霉素的抗性培养基筛选阳性转化子。提取重组酵母菌基因组 DNA，以其为模板，利用引物 D3-F/D10-R 进行 PCR 鉴定。从图 4 可以看出，阳性重组菌可扩增出 3 000 bp 左右的片段，条带大小与理论值相符，证明 pPIC3.5K–*Δ3(E)-sd–2a–Δ10(E)-sd* 与毕赤酵母 GS115 染色体基因组重组成功。

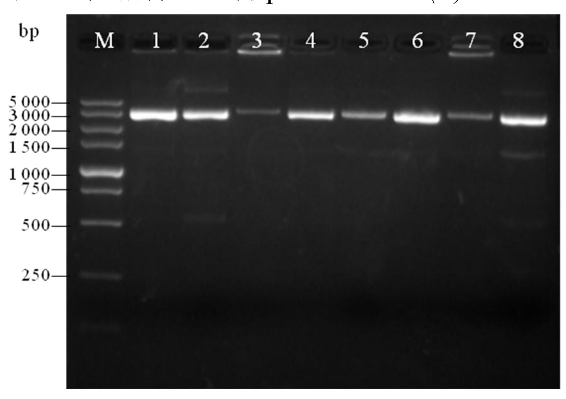


图 4　转化子的 PCR 鉴定结果

Fig. 4　Identification of transformants by PCR. M: DNA maker; 1-8: PCR products with primer D3-F/D10-R.

将阳性菌株接种于以甘油为唯一碳源的培养基中，30 ℃培养 1 d 后，收集菌体进行甲醇诱导培养，每隔 12 h 取样，对菌体进行 SDS-PAGE 分析。结果如图 5 所示，从图中可以看出，经 84 h 后Δ3(E)-SD（分子量约 48 kDa）和Δ10(E)-SD（分子量约 65 kDa）在重组酵母中成功表达。

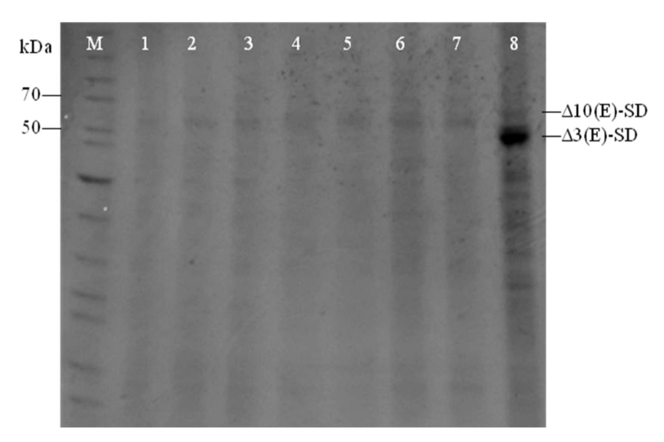


图5　重组酵母菌体蛋白的SDS-PAGE分析

Fig. 5　SDS-PAGE analysis of proteins in the recombinant yeast cells. M: protein marker; 1: 0 h; 2: 12 h; 3: 24 h; 4: 36 h; 5: 48 h; 6: 60 h; 7: 72 h; 8: 84h.

2.3 重组菌株产物分析

2.3.1 Fusaruside 的检测

对成功诱导的酵母菌细胞进行烘干，萃取，浓缩后，浸膏经 HPLC-MS 检测 fusaruside 产生情况，提取检测后的离子流，结果如图 6 所示，表明构建的工程菌能够产生 fusaruside 以及它的前体化合物 cerebrocide B，而没有转化重组载体的毕赤酵母菌则不能够生产。

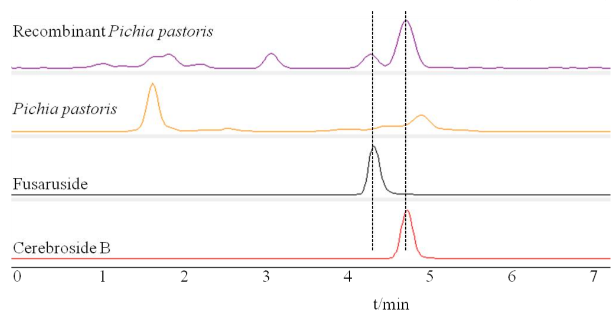


图6　重组酵母细胞提取物的HPLC-MS分析

Fig. 6　HPLC-MS analysis of extracts from the recombinant yeast cells.

2.3.2 Fusaruside 的分离纯化

经检测确定酵母菌可以产 fusaruside 之后，大规模发酵重组酵母菌，获得 3.6g 粗浸膏进行分离纯化，经 HPLC-MS 示踪，使用反相硅胶、凝胶和 HPLC 分离后获得 5 mg 纯的 fusaruside，并通过氢谱确定 fusaruside 的化学结构。如图 7 所示δ 5.34~6.06 处共有 7 个质子信号，表明该化合物有 4 个双键，比毕赤酵母中所产的 cerebroside D 多了两个双键，从而说明该化合物正确。

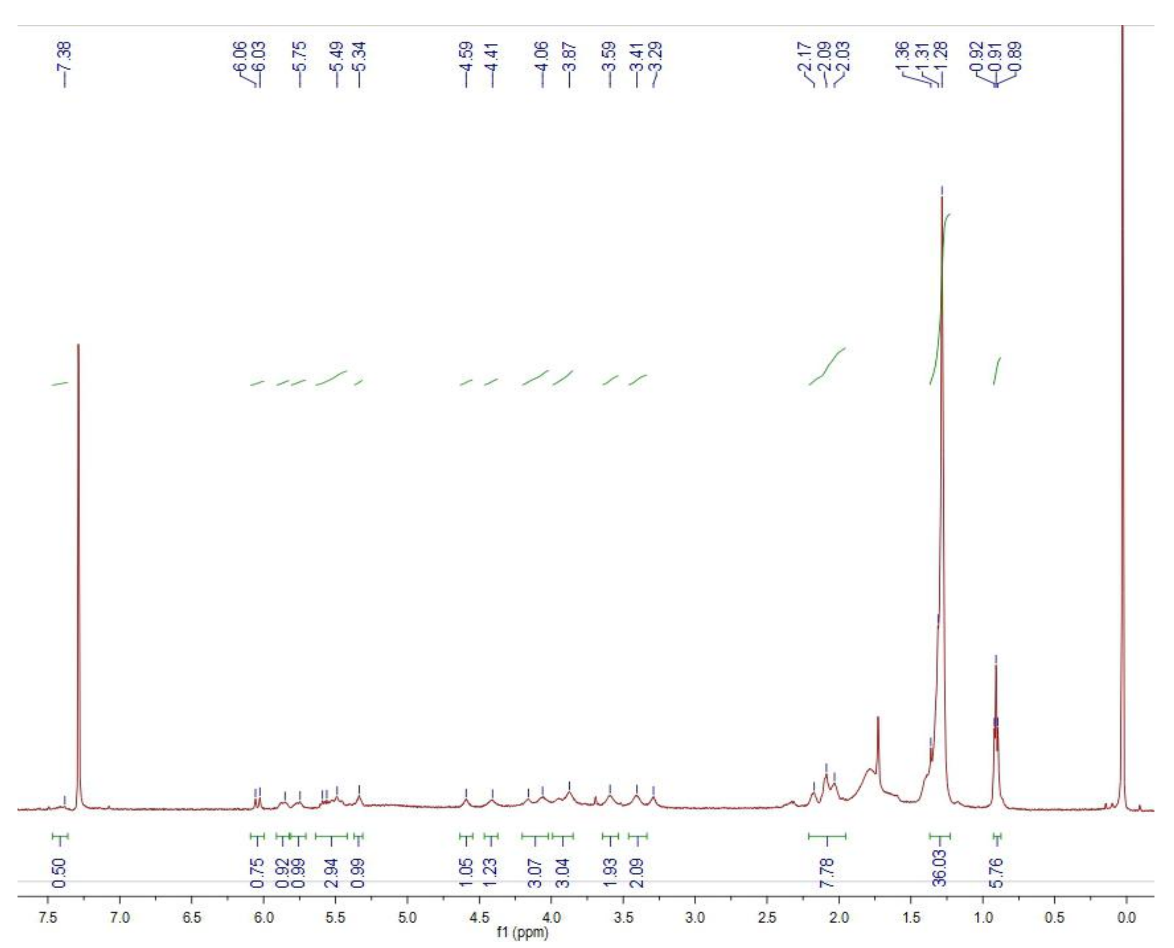


图7　Fusaruside氢谱（$CDCl_3$，400 MHz）

Fig. 7　^{1}H NMR of fusaruside ($CDCl_3$，400 MHz)

该酵母菌 fusaruside 产量与文献[7]中报道的镰刀菌产量对比如表 2 所示，由表中可知酵母菌的产率是文献中镰刀菌的 11.6 倍。

表 2　不同 fusaruside 产生菌之间产量对比

Table 2 The contrast of the yield of fusaruside from different producing strains

Producing strains	Total extract (g)	Fusaruside (mg)	Yield (mg/g)
Fusarium sp. [7]	200	24	0.12
Recombinant *P. pastoris*	3.6	5	1.39

3　讨论

我们前期通过基因敲除和异源表达实验，发现了与fusaruside生物合成相关的10位去饱和酶（Δ10(E)-Sphingolipid Desaturase，Δ10(E)-SD），并阐明了fusaruside完整的生物合成途径（图8）[12]。从中我们发现cerebroside D经过Δ3(E)-SD的脱氢反应可以生成cerebroside B，再经Δ10(E)-SD的脱氢作用即可产生fusaruside[11-13]。而化合物cerebroside D大量存在于*P. pastoris*菌体中，这意味着在*P. pastoris*中共表达这两种酶，可以将酵母菌体细胞中的cerebroside D转化为fusaruside，从而实现fusaruside的快速生物合成。

图8　Fusaruside完整生物合成途径[12]

Fig.8　Complete biosynthetic pathway of fusaruside[12]

本研究利用自剪切2A肽的多基因载体构建策略，该策略规避了多基因表达时蛋白活性不高等缺点，具备明显的优势，是目前较为理想的多基因表达策略[14]。Brazier-Hicks等利用2A肽策略在*P. pastoris*中共表达黄酮糖苷合成酶基因，获得了可以生产黄酮糖苷的重组酵母菌[15]。Beekwilder等利用该技术在酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*中重建β-胡萝卜素生物合成途径，获得了β-紫罗兰酮[16]。Geier等首次利用2A肽策略成功在*P. pastoris*中共表达9种基因，获得了可以生产紫色杆菌素和类葫芦卜素的重组酵母菌株[17]。这些成功的研究表明了该方法的有效性。本研究利用该方法成功构建了Δ3(E)-SD和Δ10(E)-SD的共表达载体，首次获得了可以生产fusaruside的重组*P. pastoris*菌株。

本研究中每3.6 g重组*P. pastoris* 的粗浸膏可获得5 mg fusaruside，与文献中报道的丝状真菌*Fusarium* sp.相比[7]，产率是其11.6倍。且重组*P. pastoris*的发酵时间更短（84 h），而丝状真菌*Fusarium* sp.的发酵时间为11 d。该重组*P. pastoris*的获得为fusaruside的进一步开发与应用奠定了基础。

Ternes等研究发现*P. pastoris*中存在两条代谢途径，其中A途径可产生fusaruside的前体cerebroside D，而B途径则会生成鞘氨醇，且B途径会对A途径有抑制作用，进而抑制cerebroside D的产量[11]。为解除抑制作用，进一步提高fusaruside产量，下一步可对*P. pastoris*中的脑苷脂合成酶（glucosylceramide synthase，

GS）基因进行过表达；结合改变*P. pastoris*的培养及诱导条件，进一步优化fusaruside的生产条件，提高产量，切实解决这种新型免疫抑制剂的来源问题。

REFERENCES

[1]Liu Y, Wang YB, Zhang Q, et al. Development in small molecule immunosuppressive drugs. Chin J New Drugs, 2011, 20(20): 1981–1988.
刘莹, 王玉斌, 张琪, 等. 新型小分子免疫抑制剂研究进展. 中国新药杂志, 2011, 20(20): 1981–1988.

[2]O'Shea, JJ, Pesu M, Borie DC, et al. A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway. Nat. Rev. Drug Discov, 2004, 3: 555–564.

[3]Wu XF, Wu XX, Guo WJ, et al. Cerebroside D, a glycoceramide compound, improves experimental colitis in mice with multiple targets against activated T lymphocytes. Toxicol Appl Pharm, 2012, 263(3): 296–302.

[4]Wu XX, Sun Y, Guo WJ, et al. Rebuilding the balance of STAT1 and STAT3 signalings by fusaruside, a cerebroside compound, for the treatment of T-cell-mediated fulminant hepatitis in mice. Biochem Pharmacol, 2012, 84(9): 1164–1173.

[5]Li J, Ferris RL. PD-1/SHP-2 negatively regulate Tc1/Th1 phenotypic responses and activation of T cells in the tumor microenvironment. J Immunother Cancer, 2014, 2(S3): 221.

[6]Wu XX, Guo WJ, Wu LM. et al. Selective sequestration of STAT1 in the cytoplasm via phosphorylated SHP-2 ameliorates murine experimental colitis. J Immunol, 2012, 189(7), 3497–3507.

[7]Shu RG, Wang FW, Yang YM, et al. Antibacterial and xanthine oxidase inhibitory cerebrosides from *Fusarium sp.* IF-121, an endophytic fungus in *Quercus variabilis*. Lipids, 2004, 39(7): 667–673.

[8] Black FJ, Kocienski P. Synthesis of phalluside-1 and Sch II using 1,2-metallate rearrangements. Org Biomol Chem, 2010, 8(5), 1188–1193.

[9]Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. Nature, 2006, 440(7086), 940–943.

[10]Farhi M, Marhevka E, Ben-Ari J, et al. Generation of thepotent anti-malarial drug artemisinin in tobacco. Nat Biotechnol, 2011, 29(12): 1072–1074.

[11]Ternes P, Wobbe T, Schwarz M, et al. Two pathways of sphingolipid biosynthesis are separated in the yeast *Pichia pastoris*. J Biol Chem, 2011, 286(13): 11401–11414.

[12]Tian Y, Zhao GY, Fang W, et al. Δ10(E)-Sphingolipid desaturase involved in fusaruside mycosynthesis and stress adaptation in *Fusarium graminearum*. Sci Rep, 2015, 5: 10486.

[13]Zaüner S, Zahringer U, Lindner B, et al. Identification and functional characterization of the 2-hydroxy fatty N-acyl-Delta3(E)-desaturase from *Fusarium graminearum*. J Biol Chem, 2008, 283(52): 36734–36742.

[14]Zhang H, Huang SC, Cai SH. Development of 2A peptide-based strategies for constructing multicistronic expression vectors. Chin Biotechno, 2013, 33(1): 104–108.
张欢, 黄思超, 蔡绍晖. 基于 2A 肽策略构建多基因表达载体的研究进展. 中国生物工程杂志, 2013, 33(1): 104-108.

[15]Brazier-Hicks M, Edwards R. Metabolic engineering of the flavone-C-glycoside pathway using poly protein technology, Metab Eng, 2013, 16: 11–20.

[16]Beekwilder J, van Rossum HM, Koopman F, et al. Polycistronic expression of a β-carotene biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* coupled to β-ionone production. J Biotechno, 2014, 192: 383–392.

[17]Geier M, Fauland P, Vogl T, et al. Compact multi-enzyme pathways in *P. pastoris*. Chem Commun, 2015, 51: 1643–1646.

(本文责编)

Biosynthesis of fusaruside based on recombinant *Pichia pastoris*

Yuan Tian, Yanling Li
(College of Life Science, Taishan Medical University, Taian 271016, Shandong, China)

Abstract: Objective: A strain of *Pichia pastoris* producing fusaruside was constructed to solve the source problem of fusaruside, a selective immunosuppressive molecule. **Method:** Two related biosynthetic genes coding delta 3(E)-sphingolipid desaturase (Δ3(E)-SD) and delta 10(E)-sphingolipid desaturase (Δ10(E)-SD) were amplified from fungus *Fusarium graminearum* PH-1. 2A peptide based strategy was used to construct the co-expression vector. Then the 2A polyprotein construct was transformed into *Pichia pastoris* GS115 for induction. Finally, *P. pastoris* cells were extracted with methanol and dichloromethane, and the extract was detected by High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometer (HPLC-MS). **Result:** The two desaturases were successfully co-expressed in *P. pastoris*. SDS-PAGE showed that the molecular weight of Δ3(E)-SD and Δ10(E)-SD were about 48 kDa and 65 kDa, respectively. HPLC-MS indicated that fusaruside could be produced by the recombinant yeast. Conclusion: Compared with *Fusarium* which producing fusaruside, the engineered yeast had shorter fermentation time and higher yield, laying a foundation for further development and application of fusaruside.

Keywords: *Pichia pastoris*, desaturase, 2A peptide, co-expression, fusaruside